

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-509368

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)10月19日

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 Q 1/68	Z N A	A 9453-4B	
C 0 7 H 21/04		B 8615-4C	
// C 1 2 N 15/09		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00 A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 13 頁)			

(21) 出願番号 特願平6-505433
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)7月28日
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)2月6日
 (86) 国際出願番号 PCT/US.93/07138
 (87) 国際公開番号 WO94/03472
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)2月17日
 (31) 優先権主張番号 925, 405
 (32) 優先日 1992年8月4日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 AU, CA, JP, KR, NO

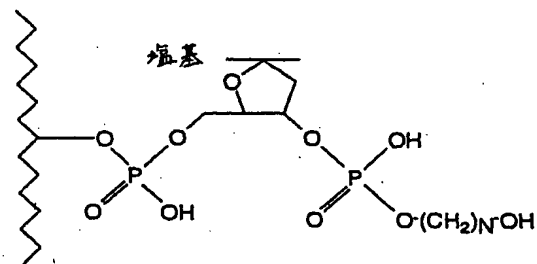
(71) 出願人 ジェン・ブローブ・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国92121カリフォルニア、サン・ディエゴ、キャンパス・ポイント・ドライブ9880番
 (72) 発明者 マクドノウ、シェロル・エイチ
 アメリカ合衆国92122カリフォルニア、サン・ディエゴ、ロビンズ・ストリート4697番
 (72) 発明者 カシアン、ダニエル・エル
 アメリカ合衆国92124カリフォルニア、サン・ディエゴ、タンバー・ロード3911番
 (74) 代理人 弁理士 青山 篠 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸配列増幅

(57) 【要約】

DNAおよびRNA合成を開始させるためにブロックされたおよびブロックされていないプライマーおよび/またはプロモータープライマーの混合物を用いて標的配列の複数のRNAコピーが自己分解的にさらにコピーを生成し、好ましくは非特異的な生成物の生成が減少した、実質的に一定の温度、イオン強度およびpHの条件下での標的核酸配列の複数のコピーを自己分解的に合成するための方法、組成物およびキットが提供される。ブロック剤または修飾剤の一つは、図に示すアルカンジオールである。本発明は、臨床試料、環境試料、法的試料および同様の試料中の特定の核酸配列を定量するためのアッセイ、クローニングおよびプローブの生成を含む目的のため、核酸標的配列のコピーを生成するのに有用である。



請求の範囲

1. 標的核酸配列の複製の相同なまたは相補的なコピーの製造法であって、
該標的核酸配列を含む試料；
該標的核酸配列の3'末端またはその近傍にハイブリダイズすることのできる配列を含む第一のプライマーまたは第一のプロモータープライマーを含む第一のオリゴヌクレオチド；
該標的核酸配列の相補体の3'末端またはその近傍にハイブリダイズすることのできる配列を含む第二のプライマーまたは第二のプロモータープライマーを含む第二のオリゴヌクレオチド；
その際、該第一のオリゴヌクレオチドおよび該第二のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも一つはプロモータープライマーを含む、別の一つが該標的核酸またはその相補体の同じ順にハイブリダイズすることのできる修飾したオリゴヌクレオチドまたは修飾したオリゴヌクレオチドと修飾していないオリゴヌクレオチドとの混合物を含む；該修飾したオリゴヌクレオチドは、修飾していないオリゴヌクレオチドに比べてポリメラーゼによる該オリゴヌクレオチドの伸長を減少またはブロックすべく修飾したものである；
1または2以上のDNAおよび/またはRNA依存性DNAポリメラーゼ；および
該第一のプロモータープライマーまたは第二のプロモータープライマーの一方または両方のプロモーターを認識することのできるRNAポリメラーゼから本質的になる混合物を、第一のオリゴヌクレオチド/標的核酸複合体が生成されDNAおよびRNA合成が起こる条件下でインキュベートすることとを特徴とする方法。
2. 該標的がRNAである請求項1に記載の方法。
3. 該標的がDNAであり、該第一のプライマーが、該標的を含む核酸の3'末端から離れた位置で該標的にハイブリダイズする請求項1に記載の方法。
4. 該インキュベーションをRNアーゼH活性の存在下で行う請求項1に記載の方法。

のRNAポリメラーゼよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。

16. 該標的核酸配列の存在を示すためのアッセイをさらに包含する請求項1に記載の方法。
17. 該方法を、1または2以上のヘルパーオリゴヌクレオチドの存在下で行う請求項1または16に記載の方法。
18. 該インキュベーションを、DMSO、ジメチルホルムアミド、エタレングリコール、グリセリンおよび重鉛の1または2以上の存在下で行う請求項1に記載の方法。
19. 該方法を本質的に一定温度で行う請求項1に記載の方法。
20. 該修飾したオリゴヌクレオチドと該修飾していないオリゴヌクレオチドとが1:1~1000:1の比で存在する請求項1に記載の方法。
21. 本質的に請求項1に記載の工程からなる請求項1に記載の方法。
22. DNA依存性DNAポリメラーゼおよびRNA依存性DNAポリメラーゼが提供される請求項2に記載の方法。
23. 増幅すべきRNA標的の5'末端を定めるため、該標的の5'末端にハイブリダイズすることのできる配列を含む第三のオリゴヌクレオチドが提供される、請求項1に記載の方法。
24. 標的核酸配列を含む試料、反対のセンスの第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチド、該第一のオリゴヌクレオチドまたは該第二のオリゴヌクレオチドの一方は該標的核酸配列の3'末端またはその近傍にハイブリダイズすることができ、該第一のオリゴヌクレオチドまたは該第二のオリゴヌクレオチドの他方は該標的核酸配列に相補的な核酸配列の3'末端またはその近傍にハイブリダイズすることができ、その際、該第一のオリゴヌクレオチドまたは該第二のオリゴヌクレオチドのうち一方は第一のプロモータープライマーを含み、本質的に修飾した成員および修飾していない成員の両方を有する単一の核酸配列からなり、その際、該修飾したオリゴヌクレオチドは、修飾していないオリゴヌクレオチドに比べてポリメラーゼによる該オリゴヌクレオチドの伸長を減少するように修飾されており、該第一のオリゴヌクレオチドまたは該第二のオリゴ

5. 該RNアーゼH活性が外來RNアーゼHによって供給される請求項2に記載の方法。

6. 該外來RNアーゼHが大腸菌からのものである請求項5に記載の方法。
7. 該修飾したオリゴヌクレオチドと修飾していないオリゴヌクレオチドとの混合物が、3'末端において異なる修飾を有するオリゴヌクレオチドの混合物である請求項1に記載の方法。
8. 該第一のオリゴヌクレオチドおよび該第二のオリゴヌクレオチドがともにプロモータープライマーを含む請求項1に記載の方法。
9. 該第一のオリゴヌクレオチドおよび該第二のオリゴヌクレオチドが、それぞれ修飾したオリゴヌクレオチドと修飾していないオリゴヌクレオチドとの混合物から本質的になる請求項1または8に記載の方法。
10. 修飾したオリゴヌクレオチドと修飾していないオリゴヌクレオチドとの該混合物が、1または2以上のアルカンジオール修飾、または3'デオキシヌクレオチド修飾、1または2以上のリボヌクレオチド、非ホスホジエステル結合を有するヌクレオチド、非ヌクレオチド修飾、該標的に相補的でない1または2以上の塩基、またはジデオキシヌクレオチドの付加を含む修飾を有する、請求項1に記載の方法。
11. 修飾したオリゴヌクレオチドと修飾していないオリゴヌクレオチドとの該混合物が、1または2以上のアルカンジオール修飾、またはコルジセシン、リボヌクレオチド、モノチオリン酸ヌクレオチド、非ヌクレオチド修飾、またはジデオキシヌクレオチドの付加を含む修飾を有する請求項10に記載の方法。
12. 逆転写酵素が該DNA依存性DNAポリメラーゼおよび該RNA依存性DNAポリメラーゼを含む請求項1に記載の方法。
13. 該逆転写酵素がさらにRNアーゼH活性を有する請求項12に記載の方法。
14. 該逆転写酵素がMMLV逆転写酵素またはAMV逆転写酵素である請求項12または13に記載の方法。
15. 該RNAポリメラーゼがバクテリオファージT7、T3、およびSP6

ヌクレオチドの他方はプライマーまたは第二のプロモータープライマーを含む、

- 1または2以上のDNA依存性DNAポリメラーゼおよび/またはRNA依存性DNAポリメラーゼ、および
該第一のプロモータープライマーまたは該第二のプロモータープライマーの一方または両方のプロモーターを認識するRNAポリメラーゼから本質的になることを特徴とする組成物。
25. 該標的がRNAである請求項24に記載の組成物。
26. 該標的がDNAであり、該第一のオリゴヌクレオチドが、該標的を含む核酸の3'末端から離れた位置で該標的にハイブリダイズする請求項24に記載の組成物。
27. 該組成物がRNアーゼH活性をさらに含む請求項24に記載の組成物。
28. 該RNアーゼH活性が大腸菌からの外來RNアーゼHによって供給される請求項27に記載の組成物。
29. 逆転写酵素が、該DNA依存性DNAポリメラーゼおよび該RNA依存性DNAポリメラーゼの両方を含む請求項24または27に記載の組成物。
30. 該逆転写酵素が該RNアーゼH活性をさらに含む請求項29に記載の組成物。
31. 該第一のオリゴヌクレオチドおよび該第二のオリゴヌクレオチドの両者が、それぞれ該RNAポリメラーゼによって認識されるプロモーターを有するプロモータープライマーを含む、請求項24に記載の組成物。
32. DMSO、ジメチルホルムアミド、エタレングリコール、重鉛およびグリセリンの1または2以上をさらに含む請求項24に記載の組成物。
33. 該混合物が増幅を本質的に一定温度で行うことを可能にする請求項24に記載の組成物。
34. 1または2以上のヘルパーオリゴヌクレオチドをさらに含む請求項24に記載の組成物。
35. 以下の成分を含むキット：
反対のセンスの第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチド、

該第一のオリゴヌクレオチドまたは該第二のオリゴヌクレオチドの一方は該標的核酸配列の3'末端またはその近傍にて複合体を形成することができ、該第一のオリゴヌクレオチドまたは該第二のオリゴヌクレオチドの他方は該標的核酸配列に相補的な核酸配列の3'末端またはその近傍にて複合体を形成することができ、その際、該第一のオリゴヌクレオチドまたは該第二のオリゴヌクレオチドのうち一方は第一のプロモータープライマーを含み、修飾した成員および修飾していない成員の両方または異なって修飾した成員の混合物を有する単一の核酸配列から本質的になり、該第一のオリゴヌクレオチドまたは該第二のオリゴヌクレオチドの他方はプライマーまたは第二のプロモータープライマーを含み、その際、該修飾した成員は、修飾していないオリゴヌクレオチドに比べてポリメラーゼによる該オリゴヌクレオチドの伸長を減少するように修飾されている。

1または2以上のDNA依存性DNAポリメラーゼおよび/またはRNA依存性DNAポリメラーゼ、および

該第一のプロモータープライマーまたは該第二のプロモータープライマーの一方または両方のプロモーターを認識するRNAポリメラーゼ。

36. 外来のRNAアーゼHをさらに含む請求項35に記載のキット。

37. 1または2以上のヘルパーオリゴヌクレオチドをさらに含む請求項35に記載のキット。

38. 該標的リボ核酸またはその相補体の存在を示すことのできる1または2以上のプローブをさらに含む請求項35に記載のキット。

39. それぞれ

XGCCGTCACCCACCAACAAGCT, XGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACC,

XCCAGGCCACTTCCGCTAACC, および

XCCGGAACAGGCTAAACCCGACGC

(式中、xは何もないかまたは酵素によって認識される配列である)よりなる群から選ばれた単一の核酸配列から本質的になる2つのオリゴヌクレオチドを含むキット。

GTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAG および

GGAGGATATGTCTCAGCGCTACC

よりなる群から選ばれた本質的に単一の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることを特徴とする方法。

45. 試料中のマイコバクテリウム・チューバーキュロシス核酸を検出する方法であって、該核酸を本質的に配列

XGCCGTCACCCACCAACAAGCT, および

XGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACC

からなる1または2以上のオリゴヌクレオチドポリマーで増幅させ、増幅した核酸を本質的に配列

GTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAG

(式中、xは何もないかまたは酵素によって認識される配列である)からなるヌクレオチドポリマーで検出することとを特徴とする方法。

46. 試料中のマイコバクテリウム・チューバーキュロシス核酸を検出する方法であって、該核酸を本質的に配列

XCCAGGCCACTTCCGCTAACC および

XCCGGAACAGGCTAAACCCGACGC

からなる1または2以上のオリゴヌクレオチドポリマーで増幅させ、増幅した核酸を本質的に配列

GGAGGATATGTCTCAGCGCTACC

(式中、xは何もないかまたは酵素によって認識される配列である)からなるヌクレオチドポリマーで検出することとを特徴とする方法。

47. 該酵素がRNAポリメラーゼである請求項43、45または46に記載の方法。

48. 該配列の1または2以上が修飾された3'末端を有する請求項41または42に記載のキット。

49. 該配列の1または2以上を含む修飾した成員および修飾していない成員を含む混合物を含む請求項41または42に記載のキット。

40. 本質的に単一の核酸配列からなり、

XGCCGTCACCCACCAACAAGCT,

XGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACC,

XCCAGGCCACTTCCGCTAACC,

および

XCCGGAACAGGCTAAACCCGACGC

(式中、xは何もないかまたは酵素によって認識される配列である)よりなる群から選ばれたオリゴヌクレオチド、または該単一の核酸配列のいずれかに相補的なオリゴヌクレオチド。

41. 本質的に以下の配列からなるオリゴヌクレオチドを含むキット:

XGCCGTCACCCACCAACAAGCT,

XGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACC, および

GTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAG

(式中、xは何もないかまたは酵素によって認識される配列である)。

42. 本質的に以下の配列からなるオリゴヌクレオチドを含むキット:

XCCAGGCCACTTCCGCTAACC,

XCCGGAACAGGCTAAACCCGACGC, および

GGAGGATATGTCTCAGCGCTACC

(式中、xは何もないかまたは酵素によって認識される配列である)。

43. 試料中のマイコバクテリウム核酸の増幅方法であって、該核酸を

XGCCGTCACCCACCAACAAGCT,

XGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACC,

XCCAGGCCACTTCCGCTAACC, および

XCCGGAACAGGCTAAACCCGACGC

(式中、xは何もないかまたは酵素によって認識される配列である)よりなる群から選ばれた本質的に単一の核酸配列からなる1または2以上のオリゴヌクレオチドで増幅することとを特徴とする方法。

44. 試料中のマイコバクテリウム・チューバーキュロシス核酸を検出する方法であって、該試料由来する核酸を

50. 該配列または該配列に相補的なオリゴヌクレオチドが、その3'末端に修飾を有する請求項40に記載のオリゴヌクレオチド。

51. 該配列を含む修飾した成員と修飾していない成員または異なって修飾した成員の混合物、またはそれに相補的な該オリゴヌクレオチドを含む請求項40に記載のオリゴヌクレオチド。

52. 該配列の1または2以上が修飾した3'末端を有する請求項43、45または46に記載の方法。

53. 該配列の1または2以上を含む修飾した成員および修飾していない成員を含む混合物を含む請求項43、45または46に記載の方法。

明 細 書 核酸配列増幅

発明の技術分野

この発明は、単独でまたは核酸の均一なもしくは不均一な混合物の（大きなまたは小さな）成分としてのいずれかで存在するかもしれない特定の核酸配列すなわち「標的配列」のコピー数を増加させる方法に関する。上記核酸の混合物は、診断試験、環境試験のため、研究用に、試薬または材料の調製のため、クロマティンなどの他の方法のため、または他の目的のために採取された試料中に含まれるものであってよい。

特定の核酸配列を選択的に増幅させることは、特異性を維持しながら診断アッセイおよび環境アッセイの感度を高めるうえで、種々の研究方法の感度、便利さ、正確さおよび信頼性を高めるうえで、および種々の目的のために特定のオリゴヌクレオチドを充分に供給させるうえで価値がある。

本発明は、便利に行うことができることのために、環境および診断試験に使用するために特に適している。

発明の技術効果

特定の核酸配列の検出および/または定量は、微生物の間定および分離、感染性疾患の診断、遺伝子異常の検出および特徴付け、癌に付随する遺伝子変位の測定、疾患に対する遺伝的脆弱性の研究、および種々のタイプの治療に対する応答の測定のため、ますます重要な技術になっている。そのような方法はまた、食品中、環境試料中、種中、および特定の微生物の存在をモニターする必要がある他のタイプの物質中に微生物を検出および定量するのに応用されている。他の応用は、法科学、人類学、考古学、および生物学において見いだされ、その際、核酸配列の関連性の測定が、犯罪容疑者の間定、実父論争の解決、系統樹および系統発生樹の構築、および種々の影響の生命の分類の援助に用いられている。

特定の核酸配列を検出および定量するための一般的な方法は、核酸ハイブリダイゼーションである。この方法は、相補的なまたは本質的に相補的な配列を含有す

る2つの核酸鎖が、適当な条件下で特異的に会合して二本鎖構造を形成することのできる能力に基づいている。特定の核酸配列（「標的配列」として知られる）を検出および/または定量するには、該標的配列の配列に相補的な配列を含有する核酸オリゴヌクレオチド（「プローブ」として知られる）を調製する。このプローブを標的配列を含むと思われる試料と混合し、ハイブリッド形成に適した条件を生成させる。プローブは、標的配列が試料中に存在するならば該標的配列とハイブリダイズする。ついで、プローブ-標的ハイブリッドを一本鎖のプローブから種々の方法の一つを使って分離させる。ついで、試料中の標的配列の量を表示するものとして、ハイブリッドに付随する核酸の量を測定する。

核酸ハイブリダイゼーションアッセイの感度は、主として、プローブの比活性、ハイブリダイゼーション反応の速度および程度、ハイブリダイズしたプローブとハイブリダイズしなかったプローブとの分離方法の性能、および核酸を検出することのできる感度によって制限される。最も感度の高い方法は、スピード、便利さおよび信頼性などのような日常的な臨床試験および環境試験に必要とされる特徴の多くを欠いているかもしれない。さらに、これらの方法の感度は、多くの所望の応用にとって充分でない。

このタイプのアッセイの種々の成分および成分工程間の相互反応の結果、感度と特異性の間にはほとんど常に逆比例の関係が存在する。それゆえ、アッセイの感度を高めるためにとった手段（プローブの比活性を高めるなど）は、信頼性の試験結果のパーセントが一層高い結果となる。このような感度と特異性との関連は、ハイブリダイゼーションアッセイの感度を改善するうえで重大な障害であった。この問題の一つの解決法は、増幅法を用いて存在する標的配列の量を特異的に増加させることである。標的配列の独特の部分を増幅させ、試料の残りの配列中にコードされた情報のかなりの部分を増幅させないことは、感度を高め、それと同時に特異性を損なうこともないに違いない。

「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」と呼ばれる核酸配列を特異的に増幅させる方法が、マリス (Mullis) らによって記載されている。[米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号および同第4,800,159号お

よびヨーロッパ特許出願第86302298.4号、86302299.2号および87300203.4号およびMethods in Enzymology, Volume 155, 1987, 335-350頁参照。) この方法では、相補的配列の各鎖を鋳型として用い、同時に起こるプライマー依存性の核酸合成のサイクルを繰り返す。増幅される配列は、合成を開始するプライマー分子の位置によって定められる。これらプライマーは、標的配列またはその相補体の3'末端部分に相補的であり、核酸合成を開始するにはこれら部位と複合体を生成する必要がある。伸長生成物の合成後、つぎの合成工程の前に両鎖を一般に熱変性により分離する。PCR法においては、相補的配列の両鎖のコピーが合成される。

PCR反応の各サイクルの終結時において新たに合成された鎖を分離させるためにPCRにおいて用いる熱分断手段は、しばしば熱変性である。その結果、熱安定性の酵素を用いるか、または熱変性工程とDNA合成の次のサイクルの開始との間に新たな酵素を添加する必要がある。熱分断の異なる温度間で反応温度を繰り返す必要があることは、PCR法の欠点である。PCRを便利なものとするためには、プログラムに組み込むことが可能な (programmable) 熱循環装置が必要である。

PCR法は、PCR反応に使用するプライマーの一つにプロモーター配列を組み込み、ついでPCR法を数回繰り返して増幅した後に一本鎖RNAの転写のために二本鎖DNAを鋳型として用いることによって、RNA転写と組合わされている。(たとえば、ムラカワ (Murakawa) ら、DNA 7: 287-295 (1988) 参照。)

特定の核酸配列の増幅のための他の方法は、一連のプライマー-ハイブリダイゼーション、伸長工程および変性工程からなり、プロモーター配列含有プライマーを使用することによってプロモーター配列を含有する中間体の二本鎖DNA分子を与えることを含む。この二本鎖DNAを用い、標的配列の核酸のRNAコピーを生成させる。得られたRNAコピーを標的配列として用いてさらにコピーを生成させることができ、複数のサイクルを行うことができる。(たとえば、バーク (Burg) ら、WO89/1050号；ジンジェラス (Gingeras) ら、WO88/

10315号 (しばしば「転写増幅システム」またはTASと呼ばれる)；カシアン (Kacian) およびフルツ (Fultz) のEPO出願第89313154号；グベイ (Davey) およびマレク (Malek) のEPO出願第88113948.9号；マレクらのWO91/02818号を参照。)

ウォーカー (Walker) ら (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 392-396 (1992年1月)) (従来技術とは認められない) は、最初の標的配列を生成するための制限エンドヌクレアーゼおよび伸長反応およびそれゆえ増幅を可能とするためのDNA/DNA複合体にニックを入れる酵素を用いた、DNA鋳型に用いるオリゴヌクレオチドによる増幅法を記載している。ベッカー (Becker) ら (EPO出願第88306717.5号) は、プライマー-標的配列とハイブリダイズさせ、得られた二本鎖を伸長反応および増幅の前に開裂する増幅法を記載している；プライマーがハイブリダイゼーションの領域を越えて伸長する場合には、伸長の前に開裂する必要がある；増幅の前に不必要な伸長反応が起こるのを防ぐためにプライマーを3'末端でブロックしなければならない。ウルデア (Urdea) (WO91/10746号) は、T7プロモーター配列を導入したシグナル増幅法を記載している。

核酸の他の増幅法としては、ヨーロッパ特許出願第320,308号に記載されたリガーゼ連鎖反応 (ligase chain reaction) (LCR) が挙げられ、この場合、少なくとも4つの別々のオリゴプローブが用いられる；オリゴプローブのうちの2つは、第三および第四のオリゴプローブが第一および第二のオリゴプローブとハイブリダイズしてライゲーション後に連結したプローブを形成するように、同じ標的鎖上の反対側の末端に適当な方向でハイブリダイズし、該連結したプローブを変性および検出することができる。他の方法はEPO出願第0427073A2号 (1991年5月15日公開) (従来技術とは認められない) に記載されているものであり、該方法においては、ヘアピンを形成することができヘアピン中に低活性のプロモーター配列を有するパンドローム性のプローブを標的配列にハイブリダイズさせ、ついで該標的配列にハイブリダイズさせた他のオリゴヌクレオチドにライゲートさせ、特定のRNA転写物が得られるようにする。

RNA-指向ポリメラーゼ、好ましくはQ β レプリカーゼの結合のための認識配列を有する置換一本鎖RNA分子を用いることにより、比較的多量のある量のRNAを生成させることができる。(たとえば、クレーマー (Kramer) らの米国特許第4,786,600号を参照) 置換分子のDNAコピー中に特定の配列を挿入し、これを複製ベクター中にクローニングし、これをRNAに転写し、ついでこれをQ β レプリカーゼを用いて増殖するのには多くの工程を必要とする。

定義

本明細書において特に断らない限り、以下の用語は以下の意味を有する。

A. 複製

「複製」は、配列中に存在するかもしれない本発明の実施を妨害しないヌクレオチド類似体または他の分子に加えて、RNAまたはDNAのいずれかを意味する。

B. 鋳型

「鋳型」は、複製ポリメラーゼによってコピーすることのできる核酸分子である。鋳型はRNAかまたはDNAのいずれであってもよく、ポリメラーゼに応じて一本鎖、二本鎖または部分的に二本鎖のいずれであってもよい。合成されたコピーは鋳型に相補的である。この発明において、コピーなる用語はまた、鋳型に等価なRNAまたはDNA配列 (当該技術分野で一般に相補配列と呼ばれる) を有する核酸をも包含する。

C. プライマー

「プライマー」は、鋳型に相補的なオリゴヌクレオチドであって、鋳型とハイブリダイズしてDNAポリメラーゼ (逆転写酵素など) による合成を開始させるためのプライマー/鋳型複合体を与え、その3'末端に連結した鋳型に相補的な共有結合した塩基の付加により伸長するものをいう。その結果、プライマー伸長生成物が得られる。DNA合成を開始するには、知られている実質的にすべてのDNAポリメラーゼ (逆転写酵素を含む) は、オリゴヌクレオチドが一鎖の鋳型と複合体を形成すること (「プライミング」) を必要とする。適切な環境下では、プライマーはプロモータープライマーの一部である。そのようなプライマーは、一般に10〜100塩基の長さ、好ましくは20〜50塩基の長さである。

ブロックすることができる。修飾した塩基および修飾していない塩基をともに有するプライマーまたはプロモータープライマーは、本発明の目的のためには本質的に同じ核酸配列からなる。言い換えると、修飾したプライマーまたはプロモータープライマーは、修飾したオリゴヌクレオチドおよび修飾していないオリゴヌクレオチドともに核酸配列上の実質上同じ位置で (プラスまたはマイナス約10塩基) ハイブリダイズする点で、異なる複合体形成配列 (プライマー) を含有してはいない。また、修飾したプロモータープライマーは、修飾していないプロモータープライマーと異なる認識配列 (プロモーター) を含有してはいない。このことは、約10塩基内で、修飾したおよび修飾していないプライマーまたはプロモータープライマーは同じであり、同じRNAポリメラーゼによって認識され、多かれ少なかれ同じ核酸配列とハイブリダイズする (必ずしも正確に同じ部位ではない) ことを意味する。好ましい態様においては、修飾したおよび修飾していないプライマーまたはプロモータープライマーは、修飾の点を除けば同一である。

プライマーまたはプロモータープライマーの核酸相補的部分の3'末端は、当業者によく知られた種々の仕方では修飾することができる。プロモータープライマーに対する適当な修飾としては、リボヌクレオチドの付加、3'デオキシヌクレオチド残基 (たとえば、コルジセピン (CO₂ グレン・リサーチ (Glen Research)) の付加、3',2'-ジデオキシヌクレオチド残基の付加、非ホスホジエステル骨格結合 (モノテオリン酸エステルなど) を有する修飾ヌクレオチドの付加、およびアーノルド (Arnold) ら (PCT US 88/03173) によって記載されているような非ヌクレオチド結合 (RS) の付加またはアルカンジオール糖鎖 (ウィルク (Wilk) ら, Nuc. Acids Res. 18:2065, 1990) (RP) の付加が挙げられ、または修飾は単にハイブリダイズする配列の3'側に核酸配列に相補的でない1または2以上のヌクレオチド残基からなっているてもよい。もちろん、他の有効な修飾も可能である。

修飾したオリゴヌクレオチドと修飾していないオリゴヌクレオチドとの混合物を増幅反応に用いることができ、また広範囲の比率 (たとえば、1:1〜1:0

D. プロモーターまたはプロモーター配列

「プロモーター」または「プロモーター配列」は、核酸分子に結合して特定の部位でRNAの転写を開始するためのシグナルとして、DNA依存性RNAポリメラーゼ (「転写酵素」) によって認識される特定の核酸配列である。結合のためには、そのような転写酵素は、一般にプロモーターおよびその相補体が二本鎖であることを要求する; 鋳型部分は二本鎖である必要はない。種々のDNA依存性RNAポリメラーゼは、種々の異なるプロモーター配列 (その転写促進剤は順番に変わらざる) を認識する。RNAポリメラーゼがプロモーター配列に結合して転写を開始するとき、該プロモーター配列は転写される配列の部分ではない。それゆえ、かくして生成されたRNA転写物はプロモーター配列を含んでいないであろう。

E. プロモータープライマー

プロモータープライマーは、プロモーターおよびプライマーからなる。プロモータープライマーは、鎖的核酸配列の3'末端に十分に相補的であるため鎖的核酸配列の3'末端またはその近傍で複合体を形成できるオリゴヌクレオチドである。このことは、プロモータープライマーが鎖的配列の末端に近くで複合体を形成するため、アッセイ、試験、クローニングまたは増幅された核酸の他の用途の要件を満たすに充分な鎖的配列の増幅を可能とすることを意味する。プロモータープライマーは鋳型として用いられて鎖的核酸配列の3'末端から伸長する相補的核酸配列を生成し、その結果、一般に二本鎖のプロモーターを形成し、該二本鎖を破砕する変性または酵素活性を受けけることになる。そのようなプロモータープライマーは、一般に長さが40〜100塩基、好ましくは40〜60塩基である。

DNAまたはRNA依存性DNAポリメラーゼはまた、鎖的配列を鋳型として用いて鎖的核酸分子に対する相補鎖を生成する。

F. 修飾したプライマーまたはプロモータープライマー

プライマーまたはプロモータープライマーの3'末端は、該末端から進行する伸長反応の速度および/または範囲を促進または減少させるため、修飾または

00:1) の修飾したオリゴヌクレオチドおよび修飾していないオリゴヌクレオチドを用いることができる。異なる3'修飾を有するオリゴヌクレオチドの混合物を用いることもできる。

G. プラス (+) およびマイナス (-) 鎖

核酸合成の議論は、核酸二本鎖の2つの相補鎖の命名の術語を採用することにより非常に簡単になり明瞭になる。伝統的に、タンパク質や構造RNAを生成するのに用いられる配列をコードする鎖は「プラス」鎖とよばれ、その相補鎖は「マイナス」鎖とよばれる。現在、多くの場合において両方の鎖とも鎖的方向性であり、一方の鎖に「プラス」の表示を他方の鎖に「マイナス」の表示を当てはめることは恣意的なものであることがわかっている。にもかかわらず、両鎖は核酸配列の方向性を示すのに非常に有用であり、本明細書においてその目的のために用いられるであろう。その場合、「プラス」鎖は第一のプライマーまたはプロモータープライマーと複合体を形成する最初の鎖的配列を示す。

H. 鎖的核酸配列、鎖的配列

「鎖的核酸配列」または「鎖的配列」は増幅すべき所望の核酸配列を有し、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよく、増幅すべき配列の5'または3'側に他の配列 (増幅しても増幅しなくてもよい) を含有していてもよい。

鎖的配列には、本発明を実行する際にプロモータープライマーがハイブリダイズする複合体形成配列を包含する。鎖的核酸配列がもともと一本鎖である場合は、該術語は (+) または (-) 鎖のいずれかを意味し、該鎖的配列に相補的な配列をも意味するであろう。鎖的核酸配列がもともと二本鎖である場合は、該術語は (+) および (-) 鎖の両方を意味するであろう。

I. DNA依存性DNAポリメラーゼ

「DNA依存性DNAポリメラーゼ」は、DNA鋳型から相補的DNAコピーを合成する酵素である。一つの例は、バクテリオファージT7 DNAポリメラーゼである。知られているすべてのDNA依存性DNAポリメラーゼは、合成を開始するには相補的なプライマー (RNAまたはDNAであってもよい) またはコポリマーを必要とする。適当な条件下では、ある種のDNA依存性DNAポリ

ラーゼはRNA鎖型から相補的なDNAコピーを合成することが知られている。

J. DNA依存性RNAポリメラーゼ (転写酵素)

「DNA依存性RNAポリメラーゼ」または「転写酵素」は、(通常、二本鎖の)プロモーター配列を有する二本鎖または部分的に二本鎖のDNA分子から複数のRNAコピーを合成する酵素である。本発明は、プロモータープライマー中の一本鎖プロモーター配列および該一本鎖プロモーター配列を認識するRNAポリメラーゼを包含することに注意すべきである。RNA分子(「転写物」)は、プロモーターのすぐ下流の位置から始まってRNA分子の5'→3'方向に合成される。転写酵素の例としては、バクテリオファージT7、T3およびSP6からのDNA依存性RNAポリメラーゼが挙げられる。

K. RNA依存性DNAポリメラーゼ (逆転写酵素)

「RNA依存性DNAポリメラーゼ」または「逆転写酵素」は、RNA鎖型から相補的なDNAコピーを合成する酵素である。知られているすべての逆転写酵素はまた、DNA鎖型から相補的なDNAコピーを複製する能力を有する；それゆえ、該ポリメラーゼはRNAおよびDNAの両方に依存性のDNAポリメラーゼである。RNA鎖型またはDNA鎖型のいずれかを用いて合成を開始するにはプライマーを必要とする。

L. RNアーゼH

「RNアーゼH」は、RNA:DNA二本鎖のRNA部分を分解する酵素である。RNアーゼHは、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼである。ニワトリの骨髄芽球症ウイルスおよびモロニー Maus 白血病ウイルスの逆転写酵素は、そのポリメラーゼ活性に加えてRNアーゼH活性を有する。いくつかのクローニングされた逆転写酵素は、RNアーゼH活性を欠いている。ポリメラーゼ活性を伴わなくとも利用できるRNアーゼH鎖もまた存在する。この分解の結果、RNA:DNA複合体からRNAが分離される。別の場合には、RNアーゼHは、RNAの部分が浮出したり (nelt off) または酵素がRNAの部分を電も戻すのを可能にしたり、または生成したRNA断片がポリメラーゼによる伸長のためのプライマーとして機能するように、単にRNAを種々の位置で切断するだけで

3' 末端を有するオリゴヌクレオチドの混合物である。そのような混合物は、ブロックされたオリゴヌクレオチドのみまたはブロックされていないオリゴヌクレオチドのみを用いた場合に比べて特定の増幅反応の効率を有意に促進させる。そのようなオリゴヌクレオチドの比率は増幅しようとする特定の鎖型配列によって変わってよいが、一般に1:1から1000:1 (ブロックされたもの/ブロックされていないもの) である。本発明では、鎖的配列は定められた3' 末端または5' 末端を有する必要はない。

本発明の一つの態様は、(a) オリゴヌクレオチド/鎖的配列複合体が形成され、適当なポリメラーゼ (たとえば、DNAポリメラーゼ) によってDNA合成が開始される条件下、鎖的配列の3' 末端部分とハイブリダイズするに充分に相補的な複合体形成配列を有し、該複合体形成配列の5' 側に二本鎖の鎖型にてRNAポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列を包含する配列を有する第一のプロモータープライマーオリゴヌクレオチドで鎖的配列を処理し、(b) 鎖的3' 末端が伸長されてRNAポリメラーゼのためのハイブリッド鎖型を生成するように、上記第一のオリゴヌクレオチド/鎖的複合体を伸長反応条件下でインキュベートし、ついで(c) 該プロモーター配列を認識するRNAポリメラーゼを用いて鎖的配列の複数のRNAコピーが生成される条件下、該ハイブリッド鎖型をインキュベートすることを包含する。本発明はまた、RNA:DNAハイブリッドのRNA部分を選択的に分解する酵素 (たとえばRNアーゼH) の作用により、工程(b)におけるRNA鎖的配列の3' 末端の生成をも包含する。かくして生成したRNAは、自己触発的に増殖して層多くの生成物を生成させる。

他の方法において、本発明は、(a) 適当なポリメラーゼ (たとえば、DNAポリメラーゼ) によってDNA合成が開始されるように第一のオリゴヌクレオチド/鎖的配列複合体が形成される条件下、鎖的 (たとえば、RNAまたはDNA) 鎖的配列を第一のオリゴヌクレオチドプライマーまたはプロモータープライマーと接触させ、(b) 鎖的(鎖的ポリメラーゼによって鎖型として用いられて鎖的に相補的な第一のDNA伸長生成物)が得られるように (もしも該第一のプラ

ある。

M. ハイブリダイズ、複合体形成

「ハイブリダイズ」および「複合体形成」なる語は、ワトソン-クリック塩基対形成により二本鎖 (または「複合体」) を形成するに充分に相補的なヌクレオチド配列間での二本鎖の形成を意味する。プロモータープライマーまたはプライマーが鎖的 (鎖型) と「ハイブリダイズ」すると、そのような複合体 (またはハイブリッド) はDNAポリメラーゼによって必要とされるプライミング機能を果たすのに充分安定であり、DNA合成を開始する。

N. 特異性

特異性は、配列およびアクセス条件に応じて鎖的配列と非鎖的配列とを識別する鎖的配列の能力を説明する特性である。

発明の要旨

本発明は、鎖的鎖的配列の複数のコピーの合成のための新規な自己触発法 (すなわち、該方法は、温度、pHまたはイオン強度などの反応条件を調節する必要なく自動的に増殖する) に関する。

本発明は、オリゴヌクレオチド/鎖的配列複合体が形成されDNAおよびRNA合成が起こる条件下、鎖的配列を第一のオリゴヌクレオチド (鎖的配列の3' 末端部分とハイブリダイズするに充分に相補的な複合体形成配列 (これ単独でプライマーと呼ばれる) を有し、該複合体形成配列の5' 側に二本鎖の鎖型にてRNAポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列を包含する配列 (この配列はプロモータープライマーと呼ばれる) を有する) および第二のオリゴヌクレオチド (鎖的配列の相補鎖とハイブリダイズするに充分相補的な複合体形成配列を有するプライマーまたはプロモータープライマー) で処理することと特徴とする。この発明において、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドの一方または両方が、ブロックされたオリゴヌクレオチド配列とブロックされていないオリゴヌクレオチド配列との混合物であるか (ブロックされたオリゴヌクレオチドは、DNAポリメラーゼによるプライマー伸長の速度および/または範囲を回過または減少させるように修飾された3' 末端を有する)、または異なる

プライマーがブロックされていないならば)、該第一のオリゴヌクレオチドを伸長反応条件下でインキュベートし、(c) 該鎖的RNA分子である場合は該RNA鎖的鎖を選択的に分解する酵素を用いて該RNA鎖的鎖からDNA伸長生成物を分離させ、または該鎖的DNA分子である場合は2つのDNA鎖を分離させ (たとえば、90〜100℃に加熱するかまたは他の手段により)、(d) 該DNA伸長生成物を、プライマーまたはプロモータープライマーを包含し該DNA伸長生成物の3' 末端部分とハイブリダイズするに充分相補的な複合体形成配列を有する第二のオリゴヌクレオチドと、第二のオリゴヌクレオチド/伸長生成物複合体が生成され、該プライマー上のブロック分子に応じて上記のようにDNA合成が開始される条件下で接触させることを特徴とする。この発明において、第一のオリゴヌクレオチドがプロモータープライマーでないならば第二のオリゴヌクレオチドがプロモータープライマーである (このことは、第二のオリゴヌクレオチドが、複合体形成配列の5' 側にRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を包含する配列を有することを意味する)。加えて、第一のオリゴヌクレオチドおよび/または第二のオリゴヌクレオチドは、ブロックされたオリゴヌクレオチドおよび/またはブロックされていないオリゴヌクレオチドの混合物かまたは異なる3' 末端を有するオリゴヌクレオチドの混合物のいずれかから構成される。

増幅反応は、本質的に必要な反応物および試薬からなる混合物中で行われる。しかしながら、そのような混合物はまた、本発明の増幅に定性的に影響を及ぼさない (たとえば、反応のメカニズム) 酵素や他の置換物 (substituents) を含有しているもよい。そのような置換物は、破壊される増幅の量に影響を及ぼしてもよい。たとえば、該混合物は、同じ鎖的配列のための他のプロモータープライマーを含有しているもよいし、または「ヘルパー」オリゴヌクレオチドを含有しているもよい。そのようなヘルパーオリゴヌクレオチドは、ホーガン (Hogan) らによって記載された (米国特許第5,030,557号 (参照のため本明細書に引用する)) ハイブリダイゼーションヘルパープロブと同様の仕方、すなわち鎖的鎖が有する二次構造を有している場合であってもプロモータープライマーの該鎖的鎖への結合を助けることによって、用いられる。そのようなヘル

パオリゴヌクレオチドの使用の点において類似しているにもかかわらず、そのようなヘルパオリゴヌクレオチドが本発明の効率に悪影響を及ぼすことなく増幅プロトコルにおいて用いることができることは驚くべきことである。

第一のオリゴヌクレオチドがプロモータープライマーで第二のオリゴヌクレオチドがプライマーであるか、またはその逆、または第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドの両方がプロモータープライマーであってよく、同一のプロモーター（プロモーターが同じRNAポリメラーゼによって認識されるという意味において）または異なるプロモーターのいずれを有していてもよい。増幅した複製をクローニングに用いる場合には、異なるプロモーターを用いることが特に有用である。ついで、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドおよび標的配列から生成されたRNAを用い、標的配列の複製のコピー（相補的な複製配列および相同な複製配列の両方を意味する）を自己触発的に合成させることができる。

本発明の修飾したプライマーまたはプロモータープライマーは、DNAポリメラーゼによる典型的なプライマーの伸長を促進（減少またはブロック）させる修飾を所定のプライマーまたはプロモータープライマーの3'末端またはその近傍（3塩基内）に有する単一の複製配列から本質的になる。好ましくは、この修飾したプライマーまたはプロモータープライマーは、異なる複製配列を有する1または2以上の他のプライマーまたはプロモータープライマー（これらはまた、ブロックされたオリゴヌクレオチドとブロックされていないオリゴヌクレオチドとの混合物であってよい）とともに、本質的に同じ複製配列からなる修飾していないプライマーまたはプロモータープライマーと混合する。本発明はまた、その3'末端またはその近傍に2以上の修飾を有するプライマーおよびプロモータープライマーの混合物の使用をも包含する。

加えて、本発明の他の側面において、増幅しようとする配列がDNAである場合は、適切な予備的手順により、RNAコピーの生成（ついで本発明に従って増幅させることができる）を促進させることができる。それゆえ、本発明はまた、本発明の増幅法とともに用いるための予備の手順にも関するものであり、該手順

は増幅すべきコピー数を増加させることができるのみならず、増幅のためのDNA配列のRNAコピーをも提供することができる。

さらに別の側面において、本発明は、第二のプライマー結合部位の近傍でハイブリダイズし、それによってRNAアゼHの基質を形成するDNAオリゴヌクレオチドでRNA標的配列を処理することによる、該RNA中での定められた5'末端（すなわち、知られた配列の一つ）の生成を特徴とする。ついで、この基質はRNAアゼHによって開裂されて該RNA標的の5'末端を定め、これを上記のようにして増幅させることができる。

他の側面において、本発明は、酵素のハイブリッド分離工程にDNAポリメラーゼ（逆転写酵素など）およびDNA依存性RNAポリメラーゼ（転写酵素）を協同的に作用させることにより、それ自体他の生成物を生成させるのに用いることのできる生成物を生成させ、その結果、熱サイクルなどにおける反応条件を操作させる必要なく自己触発的に反応させることも包含する。さらに、予備的手順を包含する本発明の幾つかの態様において、予備の手順の最初の工程以外のすべてを1の温度で行う。

本発明は、臨床試料、環境試料、法試料および同様の試料中の特定の複製標的配列を検出および/または定量するためのアッセイの成分として、または種々の用途のために特定の標的配列のDNAおよび/またはRNAの多数のコピーを生成させるために用いることができる。これら方法はまた、クローニングのためにDNA標的の複製のDNAコピーを生成させたり、またはプローブを生成させたり、または配列決定のためにRNAおよびDNAコピーを生成させるためにも用いることができる。

典型的なアッセイの一例において、増幅しようとする試料（RNAまたはDNA標的を含む）を、緩衝液、塩（たとえば、マグネシウムなどの2価カチオン）、ヌクレオチド三リン酸、プライマーおよび/またはプロモータープライマー（ブロックしたものおよび/またはブロックしていないもの）、ジチオトレイトールなどのチオール還元剤、およびスベルミジンなどのポリカチオンを含む緩衝

トして二次増殖を促進させる。室温（約20℃）に冷却した後、DNAおよびRNA依存性DNAポリメラーゼ活性、RNAアゼH活性およびDNA依存性RNAポリメラーゼ活性を有する酵素群を加え、混合物を37℃〜42℃で約10分から4時間インキュベートする。ついで、ルミネセンス検出したプローブを加え、60℃にて10〜30分間インキュベートし、ハイブリダイズしていないプローブ上の標識を選択的に加水分解する溶液を加え、反応液を60℃にて5〜10分間インキュベートし、ついで既知する化学ルミネセンスをルミノメーター（luminometer）で測定することにより、反応をアッセイすることができる。（たとえば、アーノルドらのPCT US88/02746号（1988年9月21日出願、1989年3月29日公開）を参照、この開示を参照のために本明細書に引用し、「HPA」と称する）本発明の生成物は、当業者に知られた他の多くのアッセイ系に用いることができる。

場合により、定められた3'末端を有しないDNA標的を100℃付近でインキュベートして二次増殖を促進させ、室温に冷却することができる。逆転写酵素を加え、反応混合物を42℃で12分間インキュベートする。反応液を再び100℃付近で反応させ、この場合はプライマー伸長生成物をDNA鋳型から分離させる。冷却後、DNAおよびRNA依存性DNAポリメラーゼ活性、RNAアゼH活性およびDNA依存性RNAポリメラーゼ活性を有する酵素群を加え、反応液を37℃〜42℃にて10分から4時間インキュベートする。DNA標的の場合は、定められた3'末端は制限エンドヌクレアーゼを用いて生成させることができる。定められた3'末端はまた、当該技術分野で知られた他の手段により生成させることができる。

本発明のさらに別の側面は、それぞれ標的複製配列およびその相補体の3'末端またはその近傍にハイブリダイズすることができる反列のセンスの第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドから本質的になる複製物であって、これらオリゴヌクレオチドの一方はプロモータープライマーであり他方はプライマーまたはプロモータープライマーのいずれかであり、これらオリゴヌクレオチドの一方または両方が、修飾された3'末端または修飾されていない

3'末端のいずれかを有する単一の複製配列、DNA依存性DNAポリメラーゼ、RNA依存性DNAポリメラーゼ、およびRNAポリメラーゼの混合物から本質的になり、該混合物は実際に、一定のpH、濃度および温度での増幅を可能とする（すなわち、これら条件のいずれも使用量によって能動的に変化させる必要がない）ものを特徴とする。該混合物はまた、RNAアゼH活性および/または本明細書に記載する他の成分も含有してよい。

他の側面において、本発明は、この増幅法または上記に記載したものなどの他の増幅法に有用な特定の配列を包含するオリゴヌクレオチドを含有するキットを特徴とする。そのような配列には、配列長に挙げた配列が含まれ、酵素（ポリメラーゼ、または制限エンドヌクレアーゼなど）によって認識される他の配列に結合させてもよい。とりわけ、これらオリゴヌクレオチドは、マイコバクテリウム（Mycobacterium）の複製、たとえばマイコバクテリウム・チューバクルーシス（M. tuberculosis）の複製を増幅させるのに有用であり、上記のように3'末端を修飾させることができる。

本発明に使用する材料は、診断キットまたは診断手順もしくは他の手順に用いる他のキットの一部に組み込むことができ、本発明はキットフォーマットで提供されるマルチウェル法に適合させることができる。

図面の簡単な説明

図1は、RPとして言及されるアルカンジオール修飾の増殖を示す。

発明の詳細な説明

本発明によれば、特定の複製標的配列の検出および/または定量用のアッセイに使用するため、または種々の用途のために特定の標的配列のDNAおよび/またはRNAの多数のコピーを生成させるための、特定の複製標的配列の増幅のための新規方法、組成物およびキットが提供される。

本発明は、有利にも、非特異的な副生成物の減少する比率にて本質的に同じ複製配列からなる、ブロックされたプロモータープライマーとブロックされていないプロモータープライマーとの混合物、または異なる3'修飾を有するプロモータープライマーの混合物を使用することによる、標的配列のRNAコピー

を合成するための増幅法を提供する。本発明において、増幅過程は広範囲の条件下、自動的および等温的に起こる。以下に記載する増幅反応は、一連の触媒的工工程である。各工程の相対速度は、増幅生成物の有効効率を決定するであろう。ブロックされたプライマーとブロックされていないプライマーとの混合物を使用すると副反応が減少し、それゆえ増幅が改善される。「プライマーダイマー」などの副生成物が記載されており、増幅反応の効率に影響を及ぼすことが当該技術分野でよく知られている。本発明はそのような副生成物の生成効率を減少させるものであり、それゆえ増幅効率を高めるものである。

本発明に適したDNAポリメラーゼとしては、ニワトリ骨髄芽球症ウイルス (AMV) 逆転写酵素やモロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) 逆転写酵素などの逆転写酵素が挙げられる。本発明に使用するプロモータープライマー中に導入するのに適したプロモーターまたはプロモーター配列は、配列を認識および結合して転写過程を開始しそれによってRNA転写物を生成するRNAポリメラーゼによって特異的に認識される核酸配列 (天然に存在するかまたは合成により生成されるかもしくは制限エンドヌクレアーゼ消化により生成されるもの) である。開始配列を認識することのできる公知の利用できるポリメラーゼが存在するプロモーター配列が使用するのに特に適している。そのようなプロモーターとしては、バクテリオファージT3、T7またはSP6からのポリメラーゼなどのある種のバクテリオファージポリメラーゼによって認識されるプロモーターが挙げられる。該配列は、RNAポリメラーゼに対する実際の認識部位を越えて広がるヌクレオチド塩基 (安定性を付加し、または分解過程に対する感受性を付与し、または転写効率を高める) を任意に包含してよい。

本発明において使用するのに適した逆転写酵素の族つかは、AMV逆転写酵素やMMLV逆転写酵素などによりRNAアーゼH活性を有するが、大量のRNAアーゼHなどのような外来のRNAアーゼHを添加するのが好ましい。たとえば、実施例 (下記参照) では外来RNAアーゼHを添加する必要がないことを示しているが、AMV逆転写酵素に存在するRNAアーゼH活性は、反応混合物中に存在する比較的多量の異種DNAによって阻害されることがある；この問題に対する一つ

の解決策は外来RNAアーゼHを添加することである。RNAアーゼHを添加する必要がある他の場合は、オリゴヌクレオチドが標的RNA上で内部的にハイブリダイズする (すなわち、標的配列ヌクレオチドが該オリゴヌクレオチドの3'末端および5'末端の両方を越えて広がるように、該オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする) 場合である。

本発明は、第一のDNA伸長反応によって生成したRNA-DNA複合体を分離するのに適性工程を必要としない。そのような適性工程は、反応混合物の温度を実質的に高めたり (一般に、周囲温度から約80℃〜約105℃に)、そのイオン強度を減少させたり (一般に10×またはそれ以上)、またはpHを変えたり (通常、pHを10またはそれ以上に高める) といった反応条件の操作を必要とする。そのような反応条件の操作は、しばしば酵素活性に影響を及ぼし、酵素をさらに添加する必要を生じし、またさらに核酸合成に適した条件に直すために反応混合物をさらに操作する必要も生じる。

混合物中の第二のオリゴヌクレオチドは、第一のオリゴヌクレオチドと同様にブロックまたは修飾されている。本発明の一つの側面において、第一のオリゴヌクレオチドに修飾されていないものを用いるならば、第二のオリゴヌクレオチドは修飾されているものを用いる。また、第一のオリゴヌクレオチドがプロモータープライマーでないならば、第二のオリゴヌクレオチドはプロモータープライマーである。さらに、第一のオリゴヌクレオチドがプライマーのみであるならば、それはブロックされていないように、第二のオリゴヌクレオチドは、実質的に単一の核酸配列からなるブロックされた鎖成員およびブロックされていない鎖成員の両方を包含するプロモータープライマーである。

置くべきことに、そのような本質的に同じ核酸配列からなるブロックされたオリゴヌクレオチドとブロックされていないオリゴヌクレオチドとの混合物は、非特異的な生成物の生成量を減少させ、それにより増幅効率を高める。

生成したRNAコピーまたは転写物は、さらに操作することなく自己触媒的に増幅する。

本発明の他の側面においては、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴ

ヌクレオチドの両方ともプロモータープライマーであり、いずれかまたはその両方が、それぞれ修飾されたプロモータープライマーおよび修飾されていないプロモータープライマーの両方であってよい。そのような場合、クロニングなどの増幅以外の目的のために第二のプロモーターを導入するのでない限り、両方のオリゴヌクレオチドがプロモータープライマーである場合は、自己触媒反応の間に二本鎖型型の両側に特異的な転写物が生成され、合成される鎖的配列のコピー数が増大される。

第一のオリゴヌクレオチド (プライマーまたはプロモータープライマー) は、鎖的配列の一方の末端を定めるので、第二のオリゴヌクレオチド (プライマーまたはプロモータープライマー) は他方の末端を定めることに注意すべきである；これら末端はまた、特定の制限エンドヌクレアーゼによって、または他の適当な手段 (天然の3'末端を含む) によっても定めることができる。RNA転写物は最初の鎖的配列と異なる末端を有していてもよいが、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとの間の配列は完全なままである。かくして生成されたRNA転写物は、さらに操作することなく上記系で自動的にリサイクルする。それゆえ、この反応は自己触媒的である。

また、いずれのオリゴヌクレオチドも、そのプライミング配列の5'側に、最終的に得られる二本鎖DNAに余分のヌクレオチド配列を付加する結果となり得るヌクレオチド配列を有していてもよい；この余分のヌクレオチド配列はプロモーター配列に属するものではない。

他の特性において、本発明は、ブロックされたオリゴヌクレオチドのみからなるか、またはブロックされていないオリゴヌクレオチドのみからなるか、または3'末端またはその近傍に異なる修飾の組合を有するオリゴヌクレオチドからなるプロモータープライマーが提供される、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドからなっている。

さらに別の態様において、増幅を促進させる添加剤の存在下で増幅を行う。ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、エチレンジリコール、グリセリン

または亜鉛などの例を用いた。

反応混合物の成分は順次または一度に加えることができる。反応は、有利にも、成分濃度などの反応成分の安定性を維持するのに適した条件下で、かつ増幅反応の間に反応条件の修飾または操作の必要なく起こる。

本発明は、臨床試料、環境試料、法試料、および同様の試料中の特定の核酸標的配列の検出および/または定量のためのアッセイの成分として、または種々の用途のために特定の鎖的配列のDNAおよび/またはRNAの多数のコピーを生成させるために用いることができる。

実施例

例1

以下の実施例は、本発明の方法の有用性を示す。これら実施例は限定するものではなく、限定するものと考えべきでない。

特に断らない限り、以下の実施例において使用する増幅のための反応条件は、100μl容量中に50mMトリス-HCl、35mM KCl、20mM MgCl₂、15mM N-アセチルシステイン、4mM rATP、4mM rCTP、4mM rGTP、4mM rUTP、1mM dATP、1mM dCTP、1mM dGTP、1mM dTTP、10%グリセリン、10%ジメチルスルホキシド、300~600単位のMMLV逆転写酵素、200~400単位のT7RNAポリメラーゼ、各0.15μMのプライマーまたはプロモータープライマー、および所定量の酵素および酵素、42℃で1時間であった。リチオトレイトール、スベルミジンおよび/またはポリエチレニミン (PEI) もまた反応混合物に有利に添加することができる。

以下の実施例に使用する酵素は、T7またはT3RNAポリメラーゼおよびモロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) 逆転写酵素である。異なるプロモーター特性を有する他のRNAポリメラーゼも適している。

相対的な増幅を以下のようにして測定した。約75フェムトモルのプロンプ、0.1Mコハク酸リチウム、pH4.7、2% (w/v) リチウムラウリルサルフェート、15mMアルドリチオール (aldrihiol)、20mM EDTAおよび2

0 mM EGTAを含有する100 μ lのルミネセンス検出したプローブ（たとえば、アクリリウムエステルで標識、上記HPA文脈を参照）溶液に、増幅反応混合物の試料（通常、10 μ l）を加え、混合した。ついで、この反応液を60℃にて20分間インキュベートし、冷却した。各ハイブリダイゼーション反応液に、300 μ lの0.6 Mホウ酸ナトリウム（pH 8.5）、1%トリトンX-100を加えた。ついで、反応液を混合し、60℃で6分間インキュベートして、ハイブリダイズしなかったプローブの化学ルミネセンス検出を破壊した。このハイブリダイズしなかったプローブの化学ルミネセンス検出の破壊法は非常に特異的である；非常にわずかのフラクションのハイブリダイズしなかったプローブのみが化学ルミネセンスを残留させる。この反応液を冷却し、200 μ lの0.1%過酸化水素、1 mM硝酸および界面活性剤、および200 μ lの1.0 N水酸化ナトリウムを加えて残留する化学ルミネセンスをルミノメーターで定量化した。このアッセイにおいて、ハイブリダイズしたプローブは光を放つ。放射された光子の量をルミノメーターで測定し、その結果を相対光単位（Relative Light Units）またはRLUとして報告する。ハイブリダイズしていないプローブの化学ルミネセンス検出を破壊する反応は100%有効ではないので、一般に約1000~2000 RLUの範囲でシグナルのバックグラウンドレベルが存在する。

同位元素で標識したプローブへのハイブリダイゼーション、プロベイング法および電気泳動を用いたアッセイを含む他の多くのアッセイもまた適用することができる。

これらの反応条件は必ずしも最適化する必要はなく、幾つかの系において示したように変えることができる。他の配列をこれらおよび他の標的配列に用いたように、使用したオリゴヌクレオチド配列は例示であって限定することを意図するものではない。

実施例1

RNA標的内の配列に相補的な修飾したプロモータープライマーで増幅が起こることを示すため、マイコプラズマ・チューバークーロシスrRNA内の配列に相補的なプロモータープライマー（SEQ ID NO: 1）を修飾し

ないかまたは3' アルカンジオール（RP）もしくは3' コルジセピン（CO）を用いて合成し、該標的RNAと同じセンスのプライマー（SEQ ID NO: 2）および3' テラヌ（teo）の標的とともに上記条件下でインキュベートした。ホーガンにより記載されているヘルパーオリゴヌクレオチド（米国特許第5,030,557号、核酸ハイブリダイゼーションの促進手段、SEQ ID NO: 4および5）を用い、標的RNAと同じセンスのプローブ（SEQ ID NO: 3）で反応液を分析した。その結果は、3' 修飾を有するプロモータープライマーで有意な増幅が起こることを示している。

プロモータープライマー修飾	RLU
修飾せず	314.445
3' コルジセピン	71.382
修飾せず	688.737
3' -RP	70.014

実施例2

この実験では、マイコプラズマ・チューバークーロシスの28S rRNAに相補的な配列を有するプロモータープライマーを3' モノチオリン酸ヌクレオチドの存在により修飾した。15ピコモルのプロモータープライマーおよびプライマー（SEQ ID NO: 6および7）を用いて0.3テラヌの標的RNAを増幅し、ついでヘルパープローブ（SEQ ID NO: 9および10）を用いて標的RNAと同じセンスを有するプローブ（SEQ ID NO: 8）で検出した。その結果は、3' モノチオリン酸修飾したプロモータープライマーは修飾していないオリゴヌクレオチドと同様に機能することを示している。

プロモータープライマー	RLU + 標的	RLU - 標的
修飾せず	2,614.079	899
3' モノチオリン酸	2,570.798	647

実施例3

修飾したプロモータープライマーおよび修飾していないプロモータープライマーの混合物が増幅アッセイにおいて機能することを示すため、15ピコモルの

のプライマーおよびプロモータープライマー（以下参照）を用いて反応を行い、実施例1に記載するようにしてアッセイした。3テラヌの標的RNAを用いた。

ピコモル	プロモータープライマー	修飾せず	CO-修飾	RLU
実験1	+ 標的	15	0	834.902
	+ 標的	3	12	971.938
	- 標的	3	12	1.456
実験2	+ 標的	3	12	1,015.199
	+ 標的	0.1	15	961.041

これらの結果は、ブロックしたオリゴヌクレオチドに対するブロックしていないオリゴヌクレオチドの比が1:150であっても、ブロックしたオリゴヌクレオチドとブロックしていないオリゴヌクレオチドとの混合物はすべてブロックしていないオリゴヌクレオチドと同等かまたは一層良好に機能したことを示している。

実施例4

この実験では、3テラヌの標的RNAを、種々の濃度のCOブロックしたプライマーおよびブロックしていないプライマー、および実施例1におけるように15ピコモルのCOブロックしたプロモータープライマーと0.1ピコモルのブロックしていないプロモータープライマーとの混合物とともにインキュベートした。生成物をハイブリダイゼーションアッセイにより検出した。

ピコモルプライマー		RLU
ブロックしたもの	ブロックしていないもの	
0	15	969.522
10	5	802.840
13	2	648.271

満足のいく増幅結果が観察されたのに加えて、驚くべきことに、ブロックしたオリゴヌクレオチドを用いて行った反応においてはブロックしていないオリゴヌクレオチドを用いて行った反応に比べて、標的に向けられない生成物の量が有意に減少することがわかった。

実施例5

この実験では、単一のオリゴヌクレオチド配列を2つの異なる3' 修飾物と混合することの効果を示した。3テラヌの標的RNAを実施例1と同様にして増幅した。プロモータープライマーを3' 末端をブロックせずに、RPでブロックして、またはCOでブロックして合成した。2ピコモルのプライマーを用いた。ピコモルプロモータープライマー

RPで修飾	COで修飾	修飾せず	RLU
0	15	0.1	450.157
2	13	0.01	681.647
2	13	0	678.871
5	10	0	755.839

この実験は、修飾していないプロモータープライマーと修飾したプロモータープライマーとの混合物または異なるタイプの修飾したプロモータープライマーの混合物で良好に増幅できることを示しており、1時間で3テラヌのRNA標的を検出することができる。

実施例6

この実験例では、修飾したおよび修飾していないプライマーおよびプロモータープライマーの混合物を用いて3テラヌのマイコプラズマ・チューバークーロシスのrRNAを増幅した。2ピコモルのRP修飾したプロモータープライマーと13ピコモルのCO修飾したプロモータープライマーとの混合物を、修飾していないプライマーまたは修飾していないプライマーと3' モノチオリン酸ヌクレオチド（PS）で合成したプライマーとの混合物とともにインキュベートした。配列およびハイブリダイゼーションプローブは実施例1と同じである。

特表平7-509368 (10)

プライマー修飾	PS修飾	RLU
修飾せず	15ピコモル	118.411
1ピコモル	14ピコモル	364.788
修飾なし		1.266

これら条件下、修飾したプライマーと修飾していないプライマーとの混合物は最も増幅する。

実施例7

この実施例においては、80テラモルのネisseria・ゴノロエアエ (Neisseria gonorrhoeae) の rRNA を、該 rRNA に相補的なプライマー (SEQ ID NO: 13) および 28ピコモルの該 rRNA 標的と同じセンスの 3' -RPPブロックしたプロモータープライマーと 2ピコモルの該 rRNA 標的と同じセンスのブロックしていないプロモータープライマー (SEQ ID NO: 14) との混合物を用いて増幅した。後つかの反応においては、ネisseria・ゴノロエアエの rRNA にハイブリダイズすることができ RNアーゼH基質を生成することのできる 3' ブロックしたオリゴヌクレオチド (SEQ ID NO: 15) を増幅に加えた。反応後のアリコートをし、AE標識したプローブおよび該 rRNA 配列に相補的な 2つのヘルパープローブ (それぞれ、SEQ ID NO: 16、17および18) にハイブリダイズさせた。

RLU -RNアーゼH基質オリゴ	RLU +RNアーゼH基質オリゴ
7.910	32.473
16.337	728.246
17.304	80.487
12.518	61.893

実施例8

この実施例では、3または30テラモルのマイコバクテリウム・チューバークーロシスの rRNA を、プライマー (SEQ ID NO: 7)、および T3RNAポリメラーゼのプロモーターを含有する 14ピコモルの 3' -RPPブロックした

プロモータープライマーと 1ピコモルのブロックしていないプロモータープライマー (SEQ ID NO: 19) との混合物で増幅した。450単位の MMLV RTを用い、200単位の T3RNAポリメラーゼを T7RNAポリメラーゼと置換し、反応を 40分後に停止させた場合は実施例1と同様にして反応を行った。

標的濃度	RLU値
30テラモル	358.053
3テラモル	75.440
0テラモル	553

これらの結果は、逆転写酵素および T3RNAポリメラーゼを用い、ブロックしたプロモータープライマーとブロックしていないプロモータープライマーとの混合物を用いて RNAを増幅することができることを示している。

実施例9

この実施例においては、RP修飾したプロモータープライマーを用いた DNA 標的の増幅を試みた。クロニングした H1V-1 DNA (3テラモル) を、30ピコモルの配列:

5'-ATAATCCACCTATCCCACTAGGAGAAAT-3'

(SEQ ID NO: 20) を有するプライマーおよび配列:

5'-AATTTAATACCACTCACTATAGGAGACCACTTGTCTATGTCGAAATGCT-3'

(SEQ ID NO: 21) を有するプロモータープライマーとともに 95℃にて 5分間インキュベートし、ついで室温に冷却した。酵素を添加した後、反応液を 37℃で 2時間インキュベートした。反応条件は、50mM トリス-HCl、40mM 酢酸カリウム (pH8)、18mM MgCl₂、5mM DTT、2mM スペルミジン、6.2mM GTP、6.2mM ATP、2mM CTP、2mM UTP、0.2mM dTTP、0.2mM dATP、0.2mM dGTP、0.2mM dCTP、800U MMLV RT、400U T7RNAポリメラーゼであった。プロモータープライマーは、修飾しないかまたは RPで 3' 末端を修飾した。プライマーと同じセンスの AE標識プローブを用いて反応液をアッセイした。示した結果は、5回行ったものの平均である。

ピコモル	プロモータープライマー	修飾せず	修飾	平均RLU
30	0			127.223
26	4			411.692
0	30			743.877

DNA 標的、とりわけ定められた 3' 末端を有しない DNA 標的の増幅が、修飾したプロモータープライマーの使用によって阻害されないことは予期しないことであり、驚くべきことであった。

この発明の本質はすべての観点において例示的なものと考えられるべきであり限定するものではなく、本発明の範囲は上記記載によるよりもむしろ添付の請求の範囲によって示され、該請求の範囲の意味および等価物の範囲内におけるすべての変更は本発明の範囲に含まれる。

配列表

配列番号: 1

配列の長さ: 55

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

GAAATTAAAT CGACTCACTA TAGGGAGACC ACAGCCGTCAGAGATAA
CCCCACCAAC AAGCT 55

配列番号: 2

配列の長さ: 31

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

GGGATAGGCC TGGGAAACTG GGTCTAATAC C 31

配列番号: 3

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

GTCTTGCTGT GGAAGCGCTTTAG 24

配列番号: 4

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

CCGGATAGGA CCACGGGATG CAT

23

配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

CGGTGTGGGA TGACCCCGG

20

配列番号: 6

配列の長さ: 47

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

AATTTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCA GGCCTTCC GCTAAC 47

配列番号: 7

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

CGCGAACA GCTAACCAC ACAC

24

配列番号: 8

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

GGAGGATATG TCTCAGCCT ACC

23

配列番号: 9

配列の長さ: 38

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

CGCTGAGAG GCAGTACAGA AAGTCTCTG GTTAGCCG

38

配列番号: 10

配列の長さ: 36

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

GGGTAACCG GTAGGGGTTG TGTGTCCGG GTTGTG

36

配列番号: 11

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

ATAATCCACC TATCCCACTA GGAGAAAT

28

配列番号: 12

配列の長さ: 55

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

AATTTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCA CACCTTGTCT TATGTCAGA
ATGCT. 55

配列番号: 13

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

GCACCTAGTT AGCCGTGCT TATCTTCAG

30

配列番号: 14

配列の長さ: 53

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

AATTTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCA AGCCTGATCC AGCCATGCCG
CCT 53

配列番号: 15

配列の長さ: 32

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列:

GCTTGGCCCC ATTGTCCAAA ATTTCCTACT GC

32

CROSS-REFERENCED DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Content of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
Y	JOURNAL OF VIROLOGY, Volume 45, No. 2, issued February 1983, J. Leib et al., "Mechanism of Action of the Endonuclease Associated with the alpha-beta and beta-beta Forms of Avian RNA Tumor Virus Reverse Transcriptase", pages 727-739, see pages 727-731.	1-4, 7-38

Form PET/SA/218 (transmittance of sealed check) only 1973)

(72) 発明者 ダックグブタ、ナニブフシャ
アメリカ合衆国92130カリフォルニア、サ
ン・ディエゴ、カーウッド・コート4221番
(72) 発明者 マカリスター、ダイアン・エル
アメリカ合衆国92123カリフォルニア、サ
ン・ディエゴ、アンロール・アベニュー
8664番

- 13—